

**NOPEAN AIVOKASVAINANALYTIIKAN MAHDOLLISUUDET
IONIMOBILITEETTISPEKTROMETRIAA KÄYTTÄEN**

Sanni Hiekkanen

Syventävien opintojen kirjallinen työ

Tampereen yliopisto

Lääketieteen yksikkö

Elokuu 2016

TIIVISTELMÄ

Tampereen yliopisto
Lääketieteen yksikkö

HIEKKANEN SANNI: NOPEAN AIVOKASVAINANALYTIIKAN
MAHDOLLISUUDET IONIMOBILITEETTISPEKTROMETRIAA KÄYTTÄEN

Syventävien opintojen kirjallinen työ, 29 sivua

Ohjaajat: LT Antti Roine, Kirurgian apulaisprofessori, LT, FT, verisuonikirurgian erl
Niku Oksala

Tämän opinnäytteen alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -ohjelmalla
Tampereen yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti.

Elokuu 2016

Avainsanat: meningeooma, glioblastooma, kudosanalytiikka, turvamarginaali, diatermia,
ionimobilitateettispektrometria, elektroninen nenä

Glioblastoomat ovat pahanlaatuisia astrozytoomia ja aikuisten yleisimpiä aivokasvaimia. Meningeomat taas ovat yleensä hyvänlaatuisia aivokalvojen kasvaimia, joita on 20 % kaikista kallon sisäisistä kasvaimista. Molempia kasvaimia poistettaessa on hoidon ja ennusteen kannalta tärkeää tunnistaa kasvaintyyppi oikein, ja etenkin rajoiltaan hyvin diffuuseja glioblastoomia operoitaessa on tärkeää poistaa makroskooppista kasvainta ympäröivää kudosta riittävästi, mutta kuitenkin mahdollisimman vähän. Intraoperatiivisen kudosanalyysin tulee tapahtua riittävän nopeasti, etteivät leikkaukset sen vuoksi tarpeettomasti pitene. Kasvainten poistossa käytetään yleisesti diatermiaa. Tällöin kudos höyrystyy ja syntyy ns. kirurgista savua. Tätä savua voidaan analysoida ionimobilitateettispektrometrilla (eNose).

Tutkimuksissa pyrimme määrittämään sian kudoksia käyttäen, onko eNosella mahdollista tehdä intraoperatiivista kudosanalyysia tarpeeksi nopeasti ja luotettavasti, jotta tekniikalla voitaisiin korvata nykyään käytössä olevat jääleikkeet.

Eri kudosten tunnistaminen onnistui peräkkäisissä poltoissa 30 sekunnin odotusajalla parhaimmillaan 57.1-prosenttisesti. Tulokset ovat lupaavia, mutta menetelmä on vielä keskeneräinen.

SISÄLLYSLUETTELO

TIIVISTELMÄ

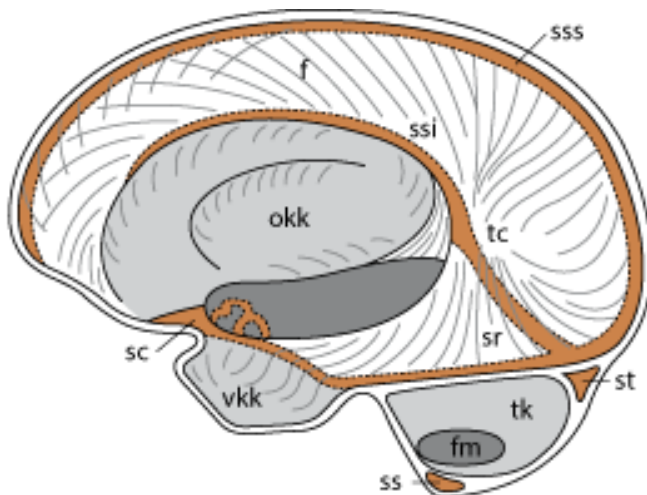
| | |
|--|-----------|
| 1. JOHDANTO | 1 |
| 1.1 GLIOBLASTOOMAT JA MENINGEOOMAT | 1 |
| 1.1.1 KASVAINTEN OMINAISUUDET | 3 |
| 1.1.2 DIAGNOSTIIKKA JA HOITOMAHDOLLISUUDET | 4 |
| 1.2 DIATERMIA AIVOKASVAINTEN HOIDOSSA | 7 |
| 1.2.1 TOIMINTAPERIAATE JA ELEKTRODIT | 7 |
| 1.3 KUDOKSEN TUNNISTAMINEN NEUROKIRURGISESSA OPERAATIOSSA | 9 |
| 1.4 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET | 15 |
| 2. TUTKIMUSMETODI | 17 |
| 2.1 NÄYTTEET JA LAITTEISTO | 17 |
| 2.2 KOEASETELMAT | 18 |
| 2.3 ANALYYSI | 19 |
| 3. TULOKSET | 20 |
| 4. POHDINTA | 21 |

1. JOHDANTO

1.1 Glioblastoomat ja meningeoomat

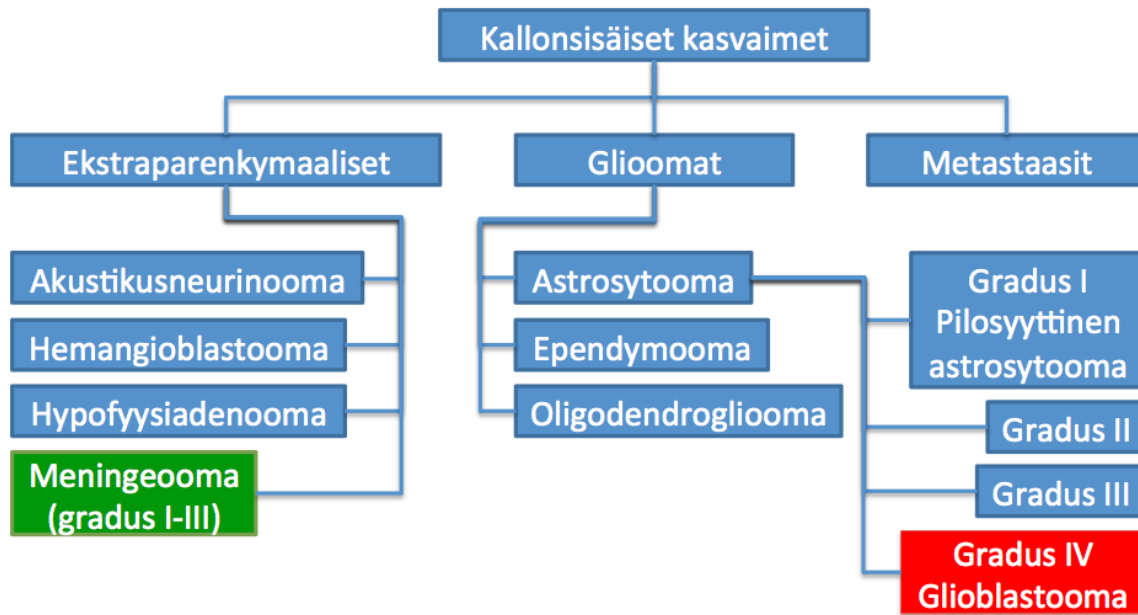
Glioblastoomat ovat pahanlaatuisia (gradus IV) astrozytoma, joiden vuosittainen insidenssi Euroopassa on alle 2/100 000. Ne ovat kuitenkin aikuisten yleisimpiä aivokasvaimia: glioblastoomien osuus kaikista hermostoperäisistä maligneista kasvaimista on noin 25 prosenttia, kallonsisäisistä kasvaimista 12–15 prosenttia ja astrozytomaista noin 50 prosenttia. (Kumar & Abbas 2005) Ilmaantuvuustiheys on korkeampi kehittyneemmissä maissa, mikä voi johtua myös kehittyneemmästä diagnostiikasta (Parkin 2007). Noin 60 prosenttia glioblastoomadiagnooseista annetaan 55–74-vuotiaille, ja tässä ikäryhmässä ilmaantuvuustiheys onkin noin 4/100 000. Glioblastoomat ovat jonkin verran yleisempiä miehillä kuin naisilla (3:2), samoin kuin kaukasialaisilla muihin rotuihin verrattuna (Brandes ym. 2008)

Meningeoomat on pääsääntöisesti benignejä, kovakalvoon (kts. kuva 1) kiinnittyviä aivokalvoperäisiä tarkkarajaisia kasvaimia. Ne ovat gliomien, joihin astrozytoma ja siten glioblastoomatkin kuuluvat, jälkeen yleisimpiä primaareja keskushermoston kasvaimia käsittäen noin 20 % primaareista kallonsisäistä kasvaimista, sekä tavallisimpia aivokalvojen kasvaimia. Meningeoomat löytyvät usein sattumalta kuvantamistutkimuksissa ja obduktioissa.



Kuva 1: Havainnekuvassa esitetään kovakalvon muodostamat rakenteet falx cerebri (f) ja tentorium cerebelli (tc). Kuvassa ruskealla merkityt laskimosinukset jäävät kovakalvon lehtien väliin. (Soinila & Kaste 2015)

Yleisimpiä meningeoomat ovat keski-ikäisillä naisilla; yleensä ikä diagnoosihetkellä on yli 50 vuotta. Sukupuolten välinen ero (3:1) liittyy kasvain hormonireseptoreihin, joista yleisimpiä ovat progesteronireseptorit. Näiden reseptorien vuoksi kasvaimet voivatkin suurentua raskausaikana. (Joensuu ym. 2013, Kumar&Abbas 2005, Mäkinen ym. 2012) Atyyppiset ja pahanlaatuiset meningeoomat ovat hiukan yleisempiä miehillä (Lee 2009). Kallonsisäisten kasvainten karkea jaottelu käy ilmi kuvasta 2.



Kuva 2: Kallonsisäiset kasvaimet voidaan pääpiirteittäin jaotella ekstraparenkymaaliisiin, glioomiin eli aivoparenkyymin gliasoluista lähteviin ja kallon ulkopuolisten syöpien metastaaseihin (mukaillen Jääskeläinen 1998).

Tunnettuja primaareille aivokasvaimille altistavia tekijöitä ovat ionisoiva säteily, sekä öljynjalostuksen väliaineille, nitriileille, nitraateille, amideille, lyijylle, vinyylidikloridille ja erilaisille torjunta-aineille altistuminen (Gomes ym. 2011). Noin 5 prosentissa glioomatapauksista on mukana perinnöllinen alttius (Malmer 2003). Meningeoomille altistaa naissukupuolen lisäksi erityisesti neurofibromatoosi 2 (NF2) –tauti, johon liittyy kromosomin 22q häviäminen, mutaatiot siinä sijaitsevassa NF2-geenissä ja geenituotteen (merliini) toimintahäiriöt. NF2-tautia sairastavilla multippelit meningeoomat ovat tavallisia. (Joensuu ym. 2013, Mäkinen ym. 2012)

1.1.1 Kasvainten ominaisuudet

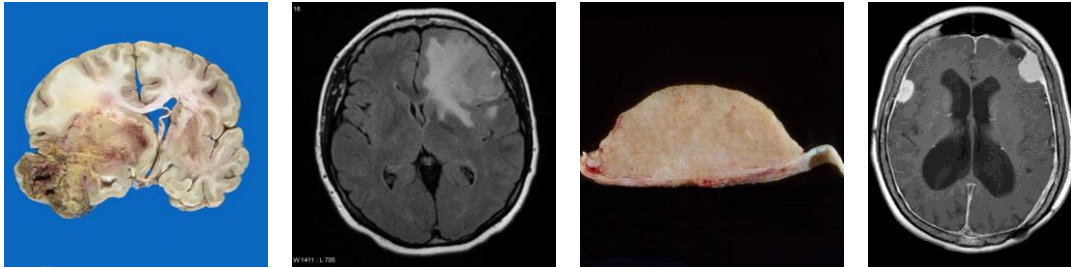
Glioblastooma on astrosyyttisistä tuumoreista pahanlaatuisin (gradus IV) ja koostuu heikosti erilaistuneista neoplastisista astrosyyteistä (Dynamed Plus 2016). Tyypillisesti glioblastoomat ovat diffuuseja nekroottisia kasvaimia, joissa on kuitenkin paljon alueellista vaihtelua: sama kasvain voi käsittää kiinteitä ja valkoisia, pehmeitä ja keltaisia sekä selvästi hemorraagisia ja kystisia alueita. Usein glioblastoomat sijaitsevat isoivoissa, useimmin supratentoriaalisessa valkoisessa aineessa. Ne leviävät herkästi valkoisen aineen ratoja, esimerkiksi kortikospinaalisia ratoja tai corpus callosumia, pitkin. Glioblastoomat kiinnittyvät harvoin aivokalvoihin, eivätkä yleensä ole multisentrisiä, mutta 20 prosentilla ne ovat multifokaalisia. Kooltaan kasvaimet vaihtelevat halkaisijaltaan muutamasta senttimetristä kokonaisen aivopuoliskon kokoihin, ja syöpäsoluja löytyy aina myös makroskooppisen kasvaimen ulkopuolelta. (Kumar & Abbas 2005)

Tärkeitä diagnostisia histopatologisia piirteitä ovat mikrovaskulaarinen proliferaatio ja/tai nekroosi, minkä lisäksi glioblastoomat ovat tyypillisesti pleomorfisia ja erittäin invasiivisia. Huomattavaa tuma-atypiaa ja runsaasti mitooseja on nähtävissä. (Dynamed Plus 2016, Kumar & Abbas 2005)

Glioblastoomat voidaan jakaa primaarisiin ja sekundaarisiin, joista ensin mainitut ovat aggressiivisempia ja esiintyvät vanhemmilla potilailla. Primaariset glioblastoomat kehittyvät ns. de novo, ilman syövän esiasteita. Tällöin tunnusomaista ovat PTEN (fosfaatti- ja tensiinihomologi)-puutokset ja EGF-reseptoriamplyfikaatiot, MDM2:n yliekspressoituminen sekä hyvin nopea eteneminen (2-3 kk). Sekundaariset glioblastoomat kehittyvät diffuuseista, gradus II astrosytoomista tai anaplastisista astrosytoomista, jolloin kasvaimissa on usein muutoksia p53-proteiinin, PDGF- α -reseptorin ja p16-proteiinin toiminnassa, ja tyypillisesti niissä on isositraatti-dehydrogenaasi 1 (IDH1) -geenin mutaatioita. (Ohgaki&Kleihues 2013, Yan ym. 2009) Kattavasti glioblastoomissa esiintyviä molekyyli-tason muutoksia on käsitelty Bastienin ym. katsausartikkelissa vuodelta 2014.

Glioblastoomista tavataan kahta histologista varianttia, jättisoluglioblastoomaa ja gliosarkoomaa. Noin 5 prosenttia kaikista glioblastoomista on jättisoluisia, joille on luonteenomaista kookkaiden, monitumaisten solujen lisäksi etenkin p53:n korkea

mutaatiotaajuus. (Kozak ym. 2009) Gliosarkoomat ovat osittain mesenkymaalista alkuperää, ja ne tunkeutuvat usein kovakalvoon tai aiheuttavat sen reaktiivista paksuuntumista. Ilmeisesti sarkomatoottisen komponenttinsa vuoksi ne erottuvat hyvin terävinä tietokonetomografiassa. (Lutterbach ym. 2001)



Kuva 3: Esimerkkejä glioblastooman (ensimmäiset kaksi kuvaa vasemmalta lukien) ja meningeooman (jälkimmäiset kaksi kuvaa) makroskooppisesta anatomiasta sekä näkymästä tietokonetomografiassa (Gaillard 19.6.2016a,b,c; Ramnani 2014,)

Meningeooma on araknoideasoluperäinen, tiivis, tarkkarajainen, lohkoinen kasvain, joka kiinnittyy usein dura materiin leveällä kannalla. Useimmiten se kasvaa hitaasti intraduraalisuuntaan työntäen kudoksia tieltään, mutta joskus kasvain infiltroi luuta (hyperostoosi) ja työntyy kallon läpi esimerkiksi orbitaan, laskimosinuksiin tai nieluun. Pahanlaatuiset meningeoomat voivat invasoida myös aivokudosta. Etenkin NF2-tautia sairastavilla meningeoomia voi olla useita (Joensuu ym. 2013, Mäkinen ym. 2012)

Meningeoomien histologinen löydös vaihtelee; tavallisesti nähdään hyvin erilaistuneita kasvainsoluja pyörteisinä rakenteina, ja mukana on usein kalkkeutumia (ns. psammoomia). Yleensä meningeoomat ovat gradus I:n meningoteliaalisia, fibroblastisia tai niiden sekamuotoja eli transitionaalisia meningeoomia (yli 90 %). Gradus II:n atyyppiset meningeoomat (5 %) ja gradus III:n anaplastiset meningeoomat (1 %) eroavat gradus I:n kasvaimista ennenkaikkea mitoosiaktiivisuudeltaan ja nekroosin esiintyvyydeltään. Kasvain ilmentää progesteronireseptoria ja epiteelimembraaniantigeenia. (Joensuu ym. 2013, Mäkinen ym. 2012)

1.1.2 Diagnostiikka ja hoitomahdollisuudet

Tyypilliset oireet ja diagnostiikka

Alkuvaiheessa kaikki aivokasvaimet aiheuttavat usein sijainnista riippuvia fokaalisia oireita, esimerkiksi pikkuaivojen kasvain voi aiheuttaa ataksiaa ja frontaalilohkon kasvain

persoonallisuusmuutoksia. Tuumorin kasvaessa ilmaantuu yleistyneitä oireita, joita ovat tyypillisimmin päänsärky, pahoinvointi ja epileptiset kohtaukset. (Chandana ym. 2008) Pienet meningeoomat löytyvät usein sattumalta ja ovat täysin oireettomia, mutta suuret, erityisen herkkiä rakenteita painavat tai aivoödemaa aiheuttavat kasvaimet saavat aikaan oireita (Greenberg 1999).

Potilas on ohjattava välittömästi epileptisen kohtauksen tai muiden neurologisten fokaalioireiden ilmaannuttua tietokonetomografiaan (CT) tai magneettikuvaukseen (MRI). Usein kasvaindiagnoosi varmistuu vasta kuukausia ensimmäisten oireiden jälkeen, varsinkin jos kyseessä ovat lievät tai epämääräiset oireet. (Brandes ym. 2008)

Aivokasvainpotilaiden diagnosoinnissa ja seurannassa käytetään gadoliniumilla tehostettua magneettikuvausta, johon tulee kuulua aksiaalinen T1-painotteinen ja FLAIR-sekvenssi. Näin saadaan hyvä käsitys kasvaimen koosta ja levinneisyydestä sekä sitä ympäröivästä ödeemasta. Glioblastoomat näkyvät tummina noduluksina T1-painotteisissa kuvissa, ja vaaleina T2-painotteisissa sekä FLAIR-sekvensseissä. (Dynamed Plus 2016) Mikrovaskulaarisen proliferaation vuoksi niissä esiintyy paljon uudissuonia, joiden aivoveriesteri on kehittymätön ja varjoaine vuotaakin yleensä kasvaimen soluvälitiloihin (Zagzag ym. 1989). Meningeoomat erottuvat magneettikuvissa ja tietokonetomografiassa tasaisesti varjoaineella latautuneina, pyöreäkköinä, tarkkarajaisina tuumoreina joihin liittyy vaihtelevissa määrin ödemaa. (Joensuu ym. 2013) Erotusdiagnoosissa tulee muistaa muiden syöpien aivometastaasit, primääri mikrogliooma, aivoabskessit, turvottava demyelinisaatio, subakuutti aivoinfarkti ja toksoplasmoosi (Greenberg 1999).

Glioblastoomien hoito ja ennuste

Glioblastoomat, kuten meningeoomatkin, hoidetaan ensisijaisesti kirurgisesti. Kasvaimen täydelliseen poistoon pyritään, mutta glioblastooman tapauksessa se on käytännössä mahdotonta, sillä kasvain infiltroi ympäröivään kudokseen ja uusiikin lähes aina. Kasvaimen mahdollisimman täydellisellä poistamisella ja aivojen dekompressiolla sekä kohonneen aivopaineen oireiden lievittämisellä pyritään parantamaan potilaiden elämänlaatua ja pidentämään elossaoloaika. Samalla saadaan histopatologista tutkimusta varten koepala, jonka perusteella sädehoito tai kemoterapia voidaan aloittaa. Toisinaan etenkin supratentoriaalisten glioblastoomien kohdalla neurologisten vaurioiden riski on niin suuri, ettei kasvainta yritetäkään poistaa täysin. (Dynamed Plus 2016)

Glioblastoomien postoperatiivinen standardihoito on fraktioitu ulkoinen sädehoito, minkä on todettu noin kaksinkertaistavan suhteellisen elossaololuvun verrattuna pelkkään leikkaushoitoon tai yhdistettyyn leikkaushoitoon ja postoperatiiviseen kemoterapiaan. Sädehoito aloitetaan kuuden viikon kuluessa leikkauksesta, ja sitä jatketaan tyypillisesti kuuden viikon ajan. Jos kasvaimia on molemmissa aivopuoliskoissa, annetaan koko aivojen sädehoito. Rekurrensiaa glioblastoomaa hoidetaan joissain tapauksissa toistuvilla sädehoidoilla. (Dynamed Plus 2016)

1970-luvulta saakka on tutkittu adjuvanttikemoterapian vaikutusta aivokasvaintilaiden eloonjäämiseen, useimmin nitrosoureaa joko ennen sädehoitoa, sen aikana tai sen jälkeen käyttäen. Nykyisin glioblastoomien standardihoitoon kuuluu temotsolomidi yhtäaikaan sädehoidon kanssa ja sen jälkeen. Temotsolomidi jakautuu kudoksiin tehokkaasti ja läpäisee myös veriaivoesteen, jolloin keskushermostoon saadaan riittäviä määriä lääkettä. Joillain potilailla on käytetty myös toisessa kirurgisessa operaatiossa implantoitavia kemoterapeuttisia impregnoituja polymeereja (Gliadel), jotka saattavat pidentää elossaoloaika. (Dynamed Plus 2016)

Hyperfraktionaatiota ja stereotaktista sädehoitoa on kokeiltu ilman merkittäviä parannuksia hoitotuloksissa. Sen sijaan fenyylialaniini-kantajalla selektiivisesti tuumorisoluihin kuljetettava radioaktiivinen boori, joka saadaan matalaenergisellä neutronisädetyksellä hajoamaan kahdeksi varaukselliseksi partikkeliksi solunsisäisesti, on antanut lupaavia tuloksia. Hoito on kuitenkin valitettavan kallis. (Joensuu ym. 2011)

Glioblastoomat ovat huonoennusteisia ja johtavat hoitamattomina kuolemaan 2–3 kuukaudessa. Vuonna 2007 yhden vuoden suhteellinen elossaololuku väestötason tutkimuksissa oli alle 30 %, kolmen vuoden 5 % ja viiden vuoden 3 %, eikä sukupuolten välillä havaittu eroja. Ikä vaikuttaa merkittävästi ennusteeseen, sillä 15–45 -vuotiaiden ryhmässä viiden vuoden suhteellinen elossaololuku oli 13 %, mutta yli 75-vuotiaiden ryhmässä alle 1 %. (Brandes ym. 2008) Vuonna 2013 julkaistussa Cochrane-katsauksessa todettiin, että temotsolomidi-kemoterapian käyttö sekä ennen että jälkeen kasvaimen poiston ja sädehoidon parantaa ennustetta primaarikasvaimen tapauksessa vähentämällä kuolleisuutta ja pidentämällä taudin etenemisvapaata aikaa (TTP, time-to-progression). Uusiutuneen syövän tapauksessa kuolleisuus ei pienene, mutta TTP kasvaa. (Hart ym. 2013) Jättisoluglioblastoomaa sairastavien ennuste on jonkin verran muita taudin muotoja parempi (Kozak ym. 2007).

Meningeoomien hoito ja ennuste

Meningeoomat hoidetaan yleensä täysin kirurgisesti, ja kokonaispoisto onnistuu 80 prosentissa tapauksista. Iäkkäiden potilaiden oireettomia meningeoomia ei välttämättä poisteta lainkaan, sillä leikkaukseen liittyy neurologisten defektien riski. Riski kasvaa, jos kasvain kiinnittyy ympäröiviin rakenteisiin. Leikkaushoito voidaan uusida, jos meningeooma uusiutuu tai saadaan poistettua alunperin vain osittain ja lisäkasvua ilmenee. Kallonpohjaan hankalasti kiinnittyviä meningeoomia voidaan hoitaa myös stereotaktisella sädehoidolla, joko kertahoitona tai fraktioituna. (Joensuu ym. 2013)

Hyvänlaatuisista meningeoomista (gradus I), joita on kaikista meningeoomista noin 90 prosenttia, uusiutuu 20 vuoden kuluessa noin 10–20 prosenttia, gradus II meningeoomista 30–40 prosenttia ja anaplastisista (gradus III) meningeoomista yli puolet (Mäkinen ym. 2012). Ellei kuvantamistutkimuksissa kahden ja viiden vuoden kohdalla nähdä uusiutumaa, rutiiniseuranta voidaan lopettaa (Joensuu ym. 2013)

1.2 Diatermia aivokasvainten hoidossa

Useimpien potilaiden kohdalla aivokasvaimet poistetaan kirurgisesti, ja ennuste riippuu merkittävästi kasvaimen mahdollisimman täydellisen poiston onnistumisesta (Agar ym. 2011). Aivo- ja muitakin kasvaimia poistetaan perinteisen skalpellin sijaan usein sähkökirurgisesti, diatermialaitetta käyttäen, sillä näin saadaan kudoksen leikkaamisen lisäksi poltettua (koaguloitua) verisuonet umpeen ja eikä leikkaushaavasta tule juurikaan vuotoa (Honkanen 2006). Diatermiaa käytettäessä syntyy palokaasua. Muut kirurgiset tekniikat jätetään tässä työssä käsittelemättä.

1.2.1 Toimintaperiaate ja elektrodit

Kirurginen diatermialaite käsittää suurtaajuuden ja –jännitteisen sähkögeneraattorin sekä elektrodit, joiden välityksellä sen antama sähköteho johdetaan potilaaseen. Elektrodeja on kaksi, joko pienipinta-alainen aktiivielektrodi ja suuripinta-alainen neutraalielektrodi (monopolaarinen diatermia) tai kaksi lähekkäin olevaa pienipinta-alaista aktiivielektrodia (bipolaarinen diatermia). Aktiivielektrodin kohdalla virtatiheys on suuri, joten polttovaikutus saadaan sen läheisyyteen. Neutraalielektrodin tehtävä on palauttaa virta laitteeseen, eikä sen kohdalla pitäisi ilmetä polttovaikutuksia pienen virtatiheyden vuoksi. Tämän varmistamiseksi sen pinta-alan tulisi olla mahdollisimman suuri. Elektrodi tulisi sijoittaa lähelle leikkauskohtaa, jotta virta kulkisi mahdollisimman lyhyen matkaa

potilaassa, mutta ei kuitenkaan liian lähelle, että virta varmasti leviäisi koko elektrodin alueelle. Lisäksi se tulisi sijoittaa mahdollisimman lihaksikkaaseen paikkaan, jossa on hyvä verenkierto, välttämällä niveliä, luuharjanteita, rasva- ja arpikudosta (Honkanen 2006). Potilas itse on tärkeä osa laitteen toimintaa, sillä virta kulkee potilaan kudosten läpi, jolloin ne aiheuttavat impedanssin elektronivirrälle ja tuottavat siten leikkaamiseen ja koagulaatioon hyödynnettävän lämmön. Virta on suuritaajuisia, jolloin vältetään potilaan neuromuskulaarinen stimulaatio ja sähköshokit. (Taheri ym. 2014)

Leikkaavan virran antojännite on koko ajan vakio, jolloin kudokseen saadaan mahdollisimman pienelle alueelle mahdollisimman suuri teho. Leikkauskärki ei kosketa kudosta vaan virta siirtyy siihen valokaaren välityksellä ja solut höyrystyvät. Haavaa ympäröivä kudos ei juuri lämpene, eikä leikkaavaa virtaa käytettäessä tapahdu koaguloitumista. Jännitteen huippuarvot ovat tällöin 1000-2000 V ja taajuus tyypillisesti 500 kHz. (Honkanen 2006) Erityisesti leikkaavaa virtaa käytettäessä vapautuu kirurgista savua; solujen palaessa ja kaasuuntuessa nopeasti niiden orgaaniset molekyylit samalla ionisoituvat, jolloin savua ja siten kudoksen molekyyliprofiilia voidaan analysoida ionimobiliteettispektrometrian (IMS) keinoin. (Schäfer ym. 2009)

Fulguroitaessa antojännitteen suuruutta vaihdellaan ja se käy leikkaavan virran jännitesuuruuksissa vain ohimenevästi. Tässäkään toimintamuodossa aktiivinen elektrodi ei kosketa kudosta, vaan virta siirtyy kudokseen valokaaren välityksellä. Koska jännite on luonteeltaan pulssimaista, valokaari näkyy suuremmalle alueelle iskeytyvinä kipinäinä ja kudokseen kohdistuu leikkaavaa toimintaa pienempi teho. Tästä syystä kudos ei leikkaannu vaan lämpenee ja koaguloituu. Yhden jännitepulssin sisällä taajuus on noin 500 kHz ja jännitteen huippuarvo 5000-7000 V. Pulssitaajuus on tyypillisesti 20 kHz. (Honkanen 2006) Jännitteen huippuarvo on hiukan leikkausvirtaa korkeampi, jotta ilman korkea impedanssi saataisiin voitettua. Usein leikkauksissa jännitettä moduloidaan siten, että saadaan ns. sekoitettua virtaa, jolla pyritään hemostaasin ja leikkaavan vaikutuksen tasapainoon. (Taheri ym. 2014)

Dessikoinnissa eli kontaktikoaguloinnissa leikkauspää koskettaa kudosta, eikä virran ja jännitteen aaltomuodoilla ole yhtä suurta merkitystä kuin edellisissä valokaareen perustuvissa käyttötavoissa. Tämä toimintamuoto aiheuttaa ympäristöön vähemmän häiriöitä, mutta voi suurella teholla käytettäessä läpäistä leikkaushanskan ja aiheuttaa sähköiskun. (Honkanen 2006)

1.2.2 Monopolaarinen diatermia

Monopolaarisessa diatermiassa käytetään pienipinta-alaista aktiivielektrodia virran syöttämiseen ja suuripinta-alaista neutraalielektrodia sen laitteeseen palauttamiseen. Se on yleisimmin käytetty kirurgisen diatermian muoto, jossa virta jakautuu potilaaseen laajalti aiheuttaen herkästi palovammoja kulkiessaan ei-toivottuja reittejä. Lisäksi virta voi kulkea myös operoivan kirurgin kautta, ja aiheuttaa häiriöitä muihin leikkaussalin laitteisiin. Monopolaarisessa diatermiassa on mahdollista käyttää leikkaavaa, fulguroivaa ja dessikoivaa virtaa. (Honkanen 2006)

1.2.3 Bipolaarinen diatermia

Bipolaarisessa diatermiassa molemmat elektrodit ovat pieniä aktiivielektrodeja, jolloin molempien kohdalla on polttovaikutus. Usein ne on sijoitettu varresta eristettyjen pinsettien päihin. Koska virta ei leviä bipolaarisessa diatermiassa potilaaseen laajalti vaan keskittyy elektrodien (pinsettien) väliseen kudokseen kulkiessaan sen läpi elektrodilta toiselle, se aiheuttaa perinteistä monopolaarista diatermiasta vähemmän palovammoja ja laitehäiriöitä. (Honkanen 2006)

Virran keskittyessä pienelle alueelle esimerkiksi pienten suonten koagulointi ilman ympäröivän kudoksen lämpenemistä on mahdollista bipolaarisen diatermian avulla. Siksi sen käyttö on suositeltavaa aina kun se on mahdollista. Erityisen käytännöllinen tekniikka on mikrokirurgisissa toimenpiteissä ja esimerkiksi jos potilaalla on sydämentahdistin, jonka toiminta voi häiriintyä sen läpi mahdollisesti kulkevasta virrasta. (Taheri ym. 2014). Toistaiseksi bipolaarinen diatermia ei sovellu leikkaamiseen, ainoastaan koagulointiin (Honkanen 2006).

1.3 Kudoksen tunnistaminen neurokirurgisessa operaatiossa

Magneettikuvauksessa on vaikea määrittää pahanlaatuisten aivokasvaimien tarkkoja rajoja, koska niiden ympärillä on usein ödeemaa ja rajat ovat diffuusit eli kasvainsolujen määrä terveeseen kudokseen seassa vähenee pikkuhiljaa kasvaimesta pois päin siirryttäessä. Lisäksi kasvaimet ovat usein epä säännöllisen muotoisia, ja koska leikkaustilanteessa on tasapainoiltava kasvaimen mahdollisimman täydellisen poistamisen ja toiminnallisen korteksin sekä valkoisen aineen säilyttämisen välillä, patologisia näytteitä on liki mahdotonta ottaa tarpeeksi laajalti kasvaimen poiston täydellisyyttä varmistamaan. Tämän vuoksi niitä täydentämään tarvitaan intraoperatiivisia menetelmiä kasvainten ja

etenkin niiden rajojen tunnistamiseksi, jolloin leikkauksenaikainen päätöksenteko helpottuu ja tulokset paranevat. (Agar ym. 2011)

1.3.1 Aistinvaraiset tunnistuskeinot

Makroskooppinen tunnistus

Kasvainresektion rajojen määrittäminen tapahtuu nykyään käytännössä kudoksen makroskooppisen ja mikroskooppisen tarkastelun perusteella, verraten sen tuloksia kuvantamistutkimusten löydöksiin. Tällä tavoin toteutetut nopeat, intraoperatiiviset neuropatologiset diagnoosit ovat usein yhdenpitäviä lopullisten diagnoosien kanssa, mutta etenkin glioblastoomien heterogeenisuus ja diffuusit rajat merkitsevät sitä, että resektion rajojen määrittämiseen ei tällä tavoin saada tarpeeksi tietoa. (Agar ym. 2011)

Intraoperatiiviset histologiset näytteet

Diagnostiikka ja hoito perustuvat viime kädessä patologiisiin näytteisiin, joista terveet ja kasvainsolut voidaan erottaa toisistaan morfologisten piirteiden, proliferaatioaktiivisuuden, nekroosin tai vaskularisaation esiintymisen ja tiettyjen kromosomaalisten muutosten perusteella (Agar ym. 2011). Kirurgin ollessa epävarma poistetun kudoksen laadusta, siitä voidaan tehdä jääleike ja lähettää patologille intraoperatiiviseen histologiseen tutkimukseen potilaan odottaessa nukutettuna. Tekniikka on kallis, hidas (arvio vie 20-30 minuuttia), näytteitä voidaan tutkia vain rajallinen määrä, niiden laatu voi merkittävästi vaihdella ja tulos perustuu subjektiiviseen arvioon. (Balog ym. 2013)

Muut tunnistustekniikat

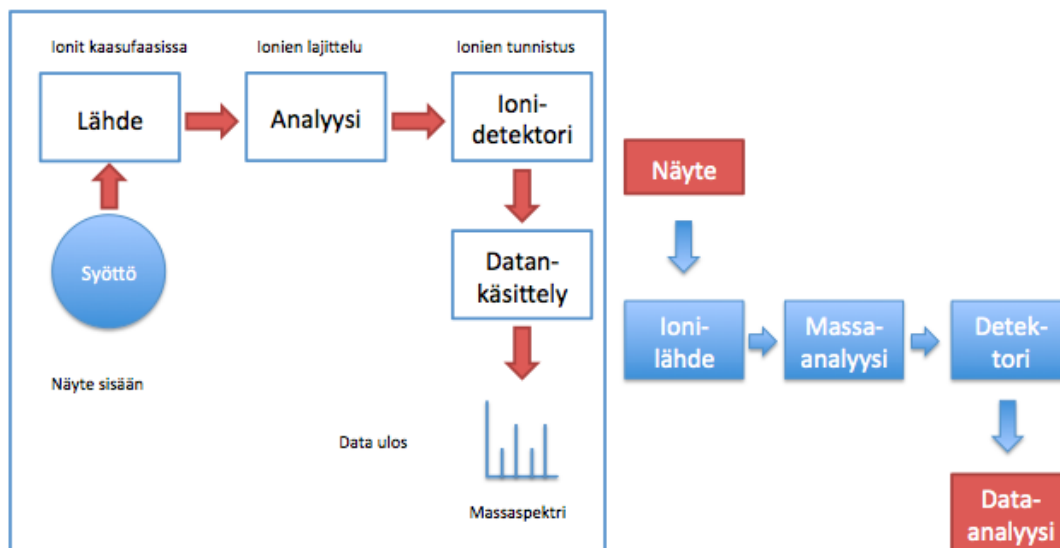
Viime aikoina on kehitetty uudenlaisia intraoperatiivisia sovelluksia kuvantamiseen, kuten intraoperatiivinen magneettikuvaus, positroniemiottomografia (PET) ja magneettiresonanssispektroskopia (MRS), sekä kuvaohjattua kirurgiaa (frameless stereotaxy, neuronavigaatio). Näin kasvaimet on mahdollista paikallistaa ja niiden rajat tunnistaa entistä paremmin, joskaan yksittäisiä syöpäsoluja ei kyetä havaitsemaan. (Agar ym. 2011) MRS-tekniikkaa onkin käytetty jo aiemmin glioblastoomien hoidon seurannassa, koska sillä nähdään esimerkiksi erot N-asetyyliaspartaatin ja kreatiinin jakautumisessa (paljon terveessä kudoksessa, vain vähän kasvainsoluissa) sekä laktaatin kertyminen kasvainsoluihin, jonka perusteella voidaan arvioida solukon metabolista

aktiivisuutta (Lee 2000). Eri tekniikoissa hyödynnetäänkin tietoja paitsi tarkasteltavien aivoalueiden anatomiasta, myös niiden toiminnasta, ja preoperatiivisia kuvia pystytään vertaamaan reaaliaikaiseen kuvadataan. Näin pyritään mahdollisimman suureen kasvaimen reunojen tunnistamisen spesifisyyteen ja sensitiivisyyteen, jotta erityisen herkäät ja toiminnaltaan ensiarvoisen tärkeät aivoalueet saataisiin säästettyä leikkauksen aikana. Käytännössä esimerkiksi neuronavigaation resoluutio on liian heikko molekulaarisen tiedon saamiseksi, ja kraniotomian yhteydessä ilmenevä aivojen deformaatio vähentää preoperatiivisten kuvien käyttökelpoisuutta leikkauksen aikana. (Agar ym. 2011)

1.3.2 Spektrometriset menetelmät

Massaspektrometria

Massaspektrometria on erittäin herkkä analyysitekniikka, jolla voidaan tunnistaa ja karakterisoida molekyylejä niiden massan ja syntyvän fragmentaatiokuvion perusteella. Sen avulla pystytään havaitsemaan femto- ja jopa zeptomolaariset (10-21 mol) molekyyliekonsentraatiot näytteistä, ja kudoksista saadaan eriteltyä samanaikaisesti satoja molekyylejä ilman radioaktiivisia tai fluoresoivia merkkiaineita. Massaspektrometri muuttaa näytteen ionisoiduksi kaasuksi ja lajittelee syntyvän ioniseoksen tyhjiössä niiden massa/varaus (m/z)-suhteen mukaan sähkö- ja/tai magneettikentän avulla. Ionit, joilla on eri m/z , osuvat eri kohtiin detektoria ja osumat muutetaan sähköiseksi signaaliksi. Kun tietyn molekyylin m/z tunnetaan, voidaan määrittää onko sitä näytteessä, ja signaalin intensiteetistä saadaan sen suhteellinen osuus. Varauksettomat molekyylit eivät päädy detektorille, vaan poistuvat spektrometrasta tyhjiötä ylläpitävän pumpun kautta. Niiden poistuminen on tärkeää, etteivät tutkittavat ionit törmäisi neutraaleihin molekyyleihin ja hajoaisi. Sekä positiivisia että negatiivisia ioneja pystytään tutkimaan massaspektrometrisesti, mutta useimmissa ionilähteissä syntyy pääasiassa positiivisia ioneja. (Kang 2012)



Kuva 3: Yksinkertaistettu kaavakuva massaspektrometrian toiminnasta (mukaillen Kang 2006)

Massaspektrometri koostuu ionilähteestä, massa-analyysiyksiköstä ja detektorista (kuva 3). Ionilähteitä on useita, joista käytetyimmät lienevät ESI (electrospray ionization), MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization) ja APCI (atmospheric pressure chemical ionization). Massaspektrometrialla on sekä kvalitatiivisia että kvantitatiivisia sovelluksia, kuten aineiden tunnistus, tietyn yhdisteen määrän selvittäminen näytteestä, molekyylejä muodostavien alkuaineiden isotooppien tunnistus, ja yhdisteen rakenteen määrittäminen sen fragmentaation perusteella. (Kang 2006) Useissa tutkimuksissa on todettu sen toimivan myös patologisten kudoksenäytteiden tunnistamisessa, kunhan tunnistuksen kannalta relevantit, suurikokoiset haihtumattomat yhdisteet (peptidit, proteiinit, nukleiinihapot, hiilihydraatit jne.) saadaan kaasufaasiin (Schwarz 2005, Chaurand 2004).

Uudemmallalla REIMS (rapid evaporative ionization mass spectrometry)- tekniikalla on pystytty lähes reaaliaikaisesti karakterisoimaan ihmiskudosta analysoimalla sähkökirurgisessa operaatiossa syntyvää kirurgista savua, kun REIMS on yhdistetty samaksi laitteeksi diatermin kanssa (iKnife). Koko prosessi, massaspektrometrin tuottaman datan analysointi ja visualisointi mukaan lukien, kestää 0,7-2,5 s. Tulokset ovat olleet lupaavia sen suhteen, että käsikäyttöisellä REIMS:lla on mahdollista tulevaisuudessa säästää rahaa ja ihmishenkiä informoidun päätöksenteon nopeutuessa ja intraoperatiivisten jääleikkeiden jäädessä tarpeettomiksi. (Balog ym. 2013)

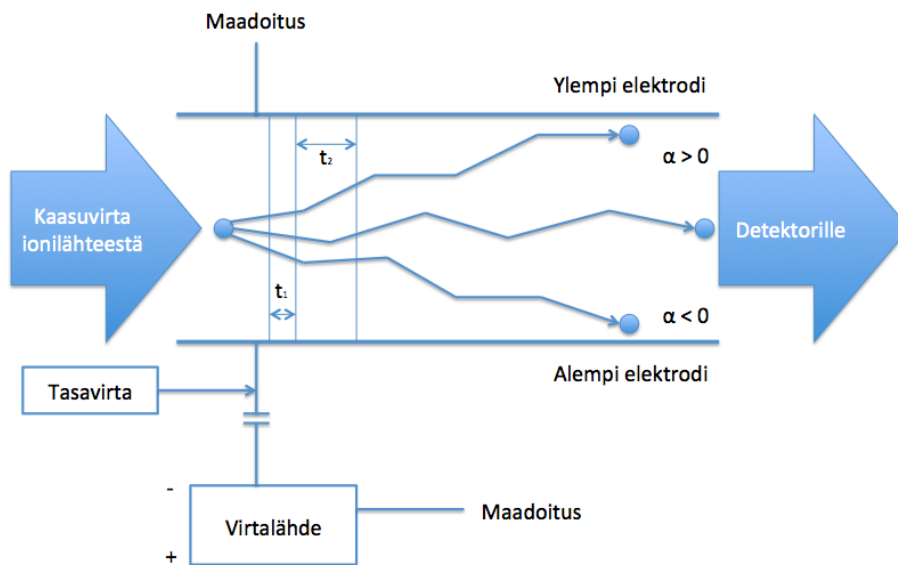
Aivokasvainten ja terveen aivokudoksen MS-spektrit

Massaspektrometriset menetelmät pystytään integroimaan leikkaustekniikkaan, ja terveen ja sairaan kudoksen spektrien on todettu eroavan toisistaan ja korreloivan vastaavasti näytepalojen histopatologisten piirteiden kanssa. Omassa tutkimuksessaan vuodelta 2011 Agar ym. totesivat, että mitä enemmän näytteessä oli kasvainsolukkoa, sitä enemmän massaspektrometriassa voitiin havaita fosfatidyylikoliineja ja –seriinejä, jotka ovat solukalvojen rakenneosia. (Agar ym. 2011) Balog ym. näyttivät kokeissaan, että esimerkiksi glioblastoomista iKnife tunnisti yli 80 % (n=6) ja REIMS:lla tuotetuissa spektreissä oli selkeitä eroja niiden ja muiden aivokasvaintyyppien välillä. (Balog ym. 2010)

Ionimobilitäteettispektrometria (IMS)

Ionimobilitäteettispektrometriassa (IMS) ionisoitu, kaasumainen näyte kulkee laitteen sisällä virtana, joka johdetaan samansuuntaiseen sähkögradienttiin. Eri ionit osuvat laitteen virtaustilan päässä olevaan detektoriin tietyn ominaisajan (time-of-flight, TOF) kuluttua, joka riippuu ionin mobilitetista eli sen massasta, varauksesta, muodosta ja koosta. Tätä ominaisaikaa IMS käyttää parametrinaan. Lisäksi voidaan käyttää toista, virtausta vastaan kohtisuoraa sähkökenttää, jolloin ionit poikkeavat lentoradaltaan varauksestaan riippuen ja osuvat virtaustilan seinien detektoreihin. (Roine 2014)

Differentiaalinen mobilitäteettispektrometria (DMS) eroaa perinteisestä IMS:sta siten, että ionien mobilitetti muuttuu niihin kohdistetun sähkökentän voimakkuuden ja neutraalien molekyylien tiheyden suhteen funktiona (kuva 4). DMS:ssa ionit kuljetetaan kaasuvirran mukana läpi virtaustilan, jonka pinnat ovat johtavaa materiaalia ja johon kohdistetaan epäsymmetrinen sähkökenttä ($\geq 20\,000$ V/cm ja -1000 V/cm). Aallonpituus ja –amplitudi on suunniteltu siten, että osa ioneista jatkaa virtaustilan läpi suoraan detektorille ja osa osuu sen seinämiin. Kun tähän lisätään suhteellisen pieni tasavirtajännite (usein 10-40 V), joka vastustaa alkuperäistä sähkökenttää, saadaan osa alkutilanteessa seinämille päätyvistä ioneista palautumaan tilan keskelle ja päätymään detektorille. Näin saadaan aikaiseksi eräänlainen säädeltävä mobilitäteettisuodatin, ja seinämien sähkökenttää muuntelemalla saadaan eri aallonmuodoilla syntyvät piikit näkyviin spektriin. (Eiceman 2013) Tässä tutkimuksessa kirurgisen savun positiivisia ja negatiivisia ioneja analysoidaan DMS:lla.



Kuva 4: Kaavakuva DMS:n toiminnasta (muokattu Eiceman 2013)

IMS toimii hyvin normaalissa ilmanpaineessa ja ionivirran kantajana voidaan käyttää huoneilmaa. Kun lisäksi energiankulutus on vähäistä ja laite voi olla kooltaan varsin pieni, IMS sopii tekniikkana kannettaviin sovelluksiin. Herkkyys on hyvä ja vasteaika lyhyt, mutta laitteet ovat herkkiä kosteudelle. (Roine 2014)

Elektroninen nenä (eNose)

DMS:n erityissovelluksena voidaan mainita elektroninen nenä (eNose), joka pyrkii jäljittelemään hajuaistin toimintaa. Siinä, samoin kuin nisäkkään hajuepiteelissä, on suuri joukko epäselektiivisiä reseptoreja niin kutsutulla multisensorisella matriisilla. Toisin kuin nisäkkään nenässä olevat, nämä pystyvät sitomaan ja siten aistimaan myös tuoksuttomia kaasuja. Kaasuseoksia eNose pystyy identifioimaan ilman aiempaa tietoa niiden koostumuksesta tai molekyylien konsentraatioista. Ensimmäistä kertaa tällainen multisensorinen matriisi esiteltiin vuonna 1982 ja tekniikka on pysynyt jokseenkin muuttumattomana, mutta nykyisin elektroniikka ja erityisesti voimalähteet ovat kehittyneet siten, että elektroninen nenä on mahdollista rakentaa kannettavaksi. Tietokoneiden suorituskyvyn kasvaessa analyysin mahdollisuudet ovat kasvaneet ja on tullut mahdolliseksi löytää kompleksisesta multidimensionaalisesta aineistosta säännönmukaisuuksia. (Roine 2014)

Tutkittavaa yhdistettä yleensä rikastetaan näytteessä ennen sen viemistä sensorimatriisille, tai vaihtoehtoisesti sekoittavat yhdisteet suodatetaan pois. Helpoin tapa on säilyttää näyte suljetussa astiassa, jolloin haihtuvat yhdisteet kertyvät kaasutilaan

kunnes tasapaino on saavutettu. Kaasutila kerätään talteen ruiskulla ja injektoidaan sensorille, jonka jälkeen sensori puhdistetaan referenssikaasulla. Automatisoitu näytteistys standardoi näytepitoisuuden ja säästää aikaa, mutta merkitsee toisaalta suurempia materiaalikuluja ja hitaampaa vasteaikaa. Tutkittava kaasutila voi olla myös dynaaminen, jolloin inertti kantajakaasu virtaa jatkuvasti sen läpi kuljettaen tutkittavat molekyylit sensorille. Näin molekyylien konsentraatio pysyy pienempänä eikä tasapainotilaa koskaan saavuteta, jolloin jatkuva analyysi on mahdollinen. Myös kiinteän faasin mikrouuttaminen on mahdollinen tapa näytteen sensorille saattamiseen. Tällöin kaasutilaan asetetaan jokin kiinteä kappale, tyypillisesti adsorboivilla molekyyleillä pinnoitettu kuitu tai useampia, jotka keräävät itseensä näytemolekyylejä. Kun kuitu/kuidut on kyllästetty, ne poistetaan kaasutilasta ja sitoutuneet molekyylit vapautetaan sensorille kuumentamalla. (Roine 2014)

Elektronisten sensoreista vanhimpia ja edelleen laajalti käytettyjä ovat metallioksidi-puolijohdesensorit, joiden toiminta perustuu sensorin johtumiskyvyn muutokseen sen ollessa vuorovaikutuksessa kaasumaisten yhdisteiden kanssa. Nämä sensorit toimivat hyvin erilaisissa ympäristöissä ja ovat stabiileja, mutta kuluttavat paljon energiaa. Uudempia sensortyyppejä ovat MOSFET (metal oxide silicon field effect) – sensorit, sähköjohtavista polymeereista valmistetut, optiset ja piezoelektriset sensorit. (Roine 2014)

1.4 Tutkimuksen tavoitteet

Kasvaimen mahdollisimman täydellisellä poistamisella on selvä vaikutus potilaan ennusteeseen (McGirt ym. 2009). Syöpäkasvaimen, kuten glioblastooman, rajat ovat yleensä diffuusit eli syöpäsolujen konsentraatio vähentyy asteittain makroskooppisen kasvaimen ympärillä, joten on tarpeen poistaa ympäröivää kudosta niin sanotun turvamarginaalin luomiseksi ja syövän uusimisen ehkäisemiseksi. Koska aivokasvaimien tapauksessa ympäröivällä kudoksella on kuitenkin ihmiselämän kannalta perustavanlaatuisia funktioita, turvamarginaali tulee minimoida.

Tasapainottelu kasvaimen täydellisen poistamisen ja terveen kudoksen säästämisen välillä synnyttää tarpeen sovelluksille, joilla pystytään intraoperatiivisesti ja mahdollisimman reaaliaikaisesti määrittämään kullakin hetkellä poistettavan kudoksen laatu. Kasvainsolujen geeniekspression, metabolian ja siten molekyylikoostumuksen

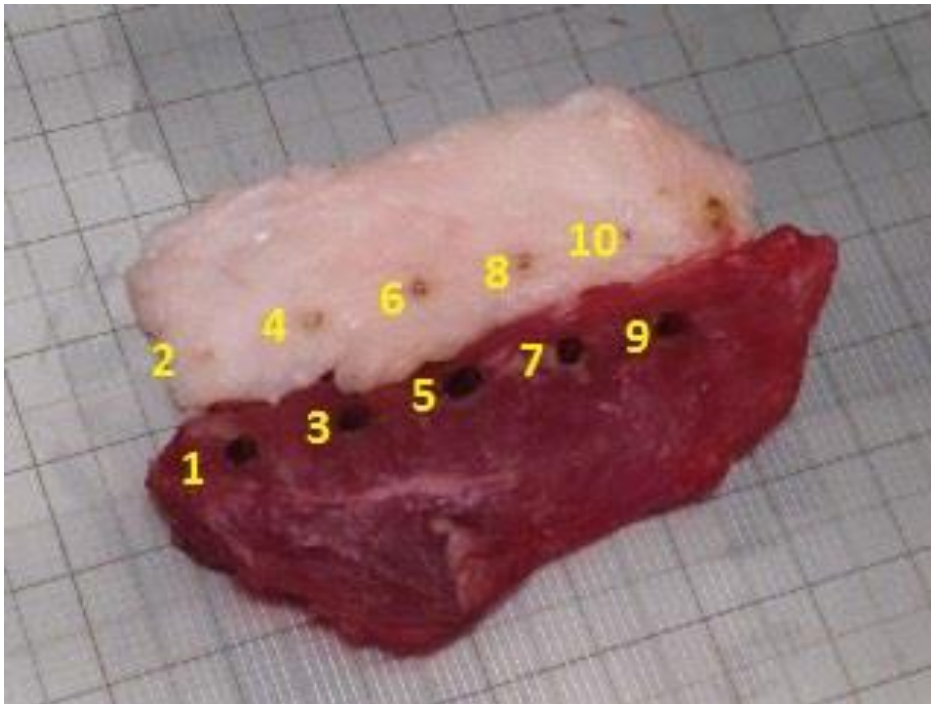
tiedetään eroavan toisistaan ja terveestä kudoksesta, mitä voidaan käyttää tunnistuksen lähtökohtana. Diatermiolla leikattaessa solut kaasuuntuvat ja kun niiden sisältämät, osittain jo diatermian vaikutuksesta ionisoituneet molekyylit ionisoidaan säteilylähteellä, kirurgista savua voidaan käyttää näytteenä DMS:lle. Jotta aivokasvainkirurgian tapaisiin vaativampiin sovelluksiin voitaisiin edetä, täytyy laitteiston kyetä erottamaan solu- ja kudostyyppjä toisistaan luotettavasti ja riittävän nopeasti. Tavoitteenamme onkin osoittaa, että eri kudokset tuottavat kukin originaalin ja tunnistettavan ionimobiliteettispektrin, ja että tällainen kudostyypille ominainen spektri on mahdollista saada intraoperatiivisen kudosanalyysin tarpeisiin riittävän nopeasti. Tämä on pohjana sille, että jatkossa menetelmää voidaan käyttää terveen ja patologisen kudoksen erottamiseen glioblastoomia ja meningeoomia leikattaessa. Laadultaan epäselvissä kohdissa kirurgi pystyy toteamaan ionimobiliteettispektristä pahanlaatuisten solujen mahdollisen olemassaolon, jolloin kasvain voidaan poistaa käyttäen mahdollisimman pientä mutta kuitenkin turvallista marginaalia.

2. TUTKIMUSMETODI

Tavoitteena oli osoittaa kokeellisesti, että diatermiaveitseen yhdistetty DMS pystyy kirurgisen savun perusteella erottamaan eri kudostyyppit luotettavasti toisistaan, sillä tämä on perusedellytys ennen vaativampiin sovelluksiin siirtymistä. Samalla on tärkeää määrittää laitteiston vaatima toipumisaika kudoksesta toiseen siirryttäessä, etteivät eri kudosten ionimobiliteettispektrit sekoitu.

2.1 Näytteet ja laitteisto

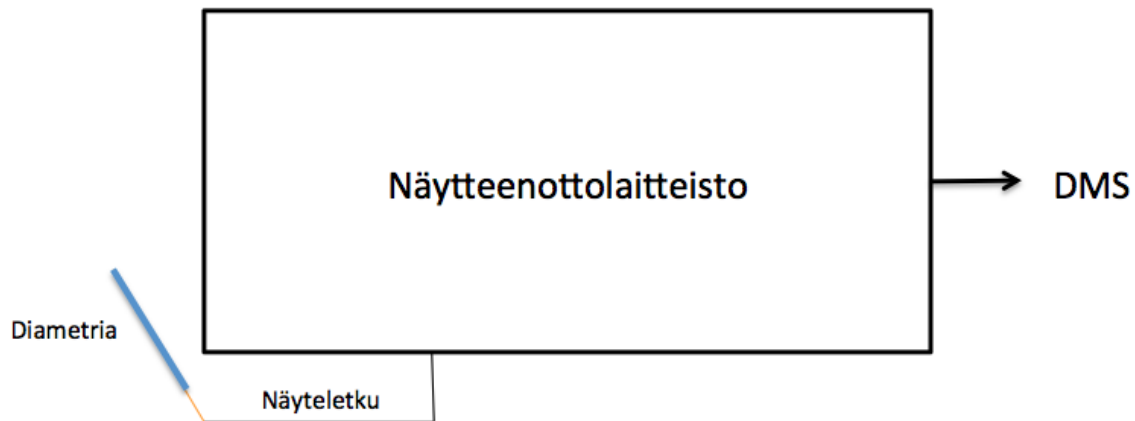
Kudostyyppistä toiseen vaihdettaessa vaadittavan vähimmäisajan määrittämisessä käytettiin paikallisen päivittäistavarakaupan lihatiskistä ostettua sian kylkipalaa (Pirkka porsaan uuniliha, Atria Oy, Suomi), jossa on makroskooppisesti selkeästi erottuvat lihas- ja rasvakerrokset. Näin pystyttiin tutkimaan mahdollista ionimobiliteettispektrien sekoittumista poltettaessa rasvaa ja lihasta peräkkäin eri aikaväleillä. Näytteet olivat kooltaan n. 10 cm x 2 cm x 1 cm (kuva 5).



Kuva 5: Sian lihasta ja rasvaa, joihin on poltettu vuorotellen reikiä diatermiällä syntyvän savun analysoimiseksi.

Varsinaista kudostenerottelukykä ja eri kudoksille ominaisten spektrien esillesaamista tutkittiin teurastamolta haetuilla sian lihas-, rasva-, maksa- munuais ja aivonäytteillä (Paijan tilateurastamo, Urjala, Suomi), jotka olivat kaikki samasta eläinyksilöstä. Kokonaisista elimistä ja suuremmista kudokseista valmistettiin kooltaan n. 20 cm x 2 cm x 1 cm näytteitä. Polttokokeissa vältettiin silmälle näkyvän sidekudoksen ja suurten verisuonten polttamista. Kaikki näytteet säilytettiin jääkaapissa (+4 °C) käyttöhetkeen saakka, eikä aistinvaraisesti pilaantunutta kudosta käytetty kokeissa.

Tutkimuksen koepoltot suoritettiin käyttäen diatermian sekoitettua virtaa. Käytetty laitteisto on esitetty kaavamaisesti kuvassa 6.



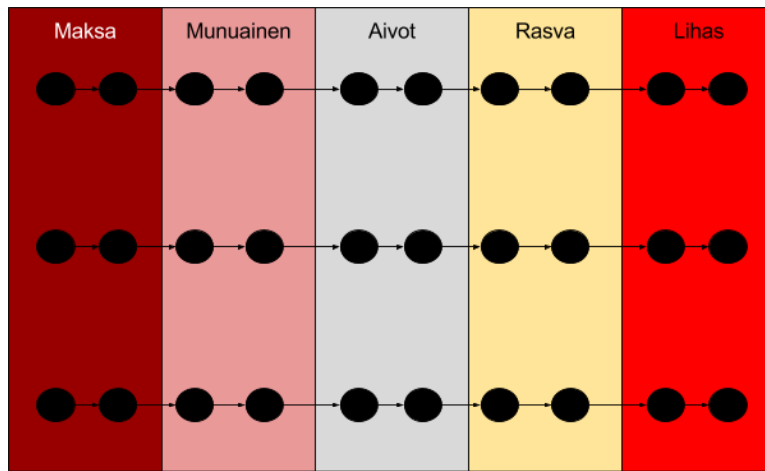
Kuva 6: Kytchentäkaavio

2.2 Koeasetelmat

Kaikki polttosarjat alkoivat taustan määrittäyksellä, jolloin analyysi suoritettiin ilman näytettä ja diatermiaveitsen ollessa poiskytkettynä. Laitteiston toipumiseen vaadittavaa aikaa testattiin polttamalla lihasta ja rasvaa vuorotellen siten, että polttojen väli oli 5 min, 2 min ja 30 s. Kussakin koesarjassa tehtiin viisi polttoa lihakseen ja viisi rasvaan. Lisäksi suoritettiin sekä rasvalla että lihaksella koesarjat, joissa joka toinen poltto oli tyhjä, eli diatermiaveistä pidettiin päällä ilman poltettavaa näytettä.

Kun sopiva aikaväli poltoille oli määritetty, testattiin kuinka tarkasti laitteisto kykenee tunnistamaan kudoksia toisistaan. Tämä tehtiin polttamalla kaikkia viittä tutkittavaa

kudosta peräkkäisinä kahden polton sarjoina. Periaatteellinen asetelma käy ilmi kuvasta 7.



Kuva 7: Koeasetelma tutkittaessa laitteiston kudostenerottelukykyä.

Kudospolttojen kestoa ja kerralla poltettavan kudosalueen laajutta vaihdeltiin, kunnes saatiin aikaiseksi optimaalinen signaali DMS:aa varten. Savukaasuanalyysi jatkui koko polton ajan.

2.3 Analyysi

Tulosten analysointiin käytettiin Matlabia, jossa luokittelumenetelmä luotiin käyttäen lineaaridiskriminanttianalyysia. Jotta ylisovittumiselta välttyttäisiin ja luokittelumenetelmän yleistettävyydestä voitaisiin olla varmoja, sitä testattiin jokaisessa mittausarjassa leave-one-out -ristivalidoinnilla. Spektrit on esitetty tiheyskarttoina, joissa mobiliteetiltaan erilaisten ionien suhteellisia osuuksia näytesavussa havainnollistetaan väreillä.

3. TULOKSET

Rasvan ja lihaksen DMS-spektrit oli mahdollista erottaa toisistaan, vaikka polttojen välillä oli aikaa vain 30 s. Pidempi odotusaika ei vaikuttanut erottelukykyyhin ainakaan parantavasti (taulukko 1).

Taulukko 1: Laitteiston vaatimaa toipumisaikaa määritettäessä saadut tulokset.

| Koeasetelman kudokset | Odotusaika (s) | Näytemäärä (kpl) | Oikein luokitellut näytteet (kpl) | Oikein luokitellut näytteet (%) |
|-----------------------|----------------|------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| Rasva+lihas | 300 | 9 | 2 | 22 |
| Rasva+lihas | 120 | 2 | 10 | 20 |
| Rasva+lihas* | 30 | 10 | 10 | 100 |
| Rasva+tyhjä* | 30 | 10 | 2 | 20 |
| Lihas+tyhjä | 30 | 10 | 10 | 100 |

**polttokokeet suoritettu muita myöhemmin, eri laimennoksella ja puhtaalla suodattimella*

Huomionarvoista on, että taulukossa tähdellä (*) merkityt kokeet on tehty myöhemmin kuin muut, jolloin näytteen laimennosta oli pienennetty ja jokaisen polttosarjan jälkeen laitteiston suodatin vaihdettiin uuteen.

Testausmielessä suoritettiin yhteensä 154 koepolttoa, joista kaikkiaan 84 näytettä (54,5 %) onnistuttiin luokittelemaan oikein. Lihas ja rasva pystyttiin 10 polton sarjassa (5 lihasnäytettä, 5 rasvakudosnäytettä) erottamaan 100 %:sesti. Poltettaessa eri kudostyyppisiä peräkkäin (kuva 7), menetelmällä pystyttiin luokittelemaan näytteet oikein parhaimmillaan 57,1 prosenttia kerroista (N=14, oikein luokiteltuja 8).

4. POHDINTA

Tutkimuksissa päästiin vaiheeseen, jossa pystyttiin eNosea käyttäen lupaavalla tarkkuudella tunnistamaan erilaisia terveitä kudoksia. Lisäksi identifioidtiin useita parannuskohteita laitteistossa ja menetelmässä.

Syöpäkasvaimia poistettaessa turvamarginaalien määrittämisessä käytetään apuna intraoperatiivisia jääleikkeitä, jotka lähetetään patologin arvioitaviksi. Tämä vie noin 20 minuuttia, jonka aikaa leikkaus on pysähdyksissä. (Balog ym. 2013). Laitteiston polttojen välissä tarvitsemaa toipumisaikaa määritettäessä lähdettiin siitä, että eNosea käytettäessä operoitavan kudoksen analyysin täytyy olla huomattavasti tätä nopeampaa, jotta tekniikan käyttöönotto voisi olla mielekästä. Viiden minuutin toipumisaika oli päätetty ehdottomaksi ylärajaksi, vaikkakin pyrittiin mahdollisimman reaaliaikaiseen analyysiin. Koesarjat eivät ole keskenään täysin vertailukelpoisia, sillä näytesavun laimennosta muutettiin kokeiden edetessä pienemmäksi ja päädyttiin vaihtamaan suodatin sarjojen välissä, mutta lopulta 30 sekuntia riitti kiistatta näytteiden virheettömään luokitteluun. Koska käytännössä ei myöskään ole tarvetta kirurgisen savun jatkuvalle, reaaliaikaiselle analyysille, vaan kannattaa pyrkiä pistemäiseen, tarvittaessa suoritettavaan kudoksen tunnistukseen, emme katsoneet tarpeelliseksi pyrkiä tämän nopeampaan laitteiston toipumiseen. On mahdollista, että toipumisaikaa polttojen välissä ei tarvita lainkaan, sillä ionisoitu savunäyte viipyy analyysissa vain millisekunteja (Eiceman 2013).

Syitä siihen, ettei kudoksia pystytty erottelemaan DMS-spektrin perusteella täydellisesti, ovat todennäköisesti ainakin kudosten keskenään erilainen savuntuotto, niin sanottu “carry-over” edellisestä näytteestä, sekä diatermia-veitsen terän karstoittuminen polttosarjan aikana.

Eri kudokset tuottavat samalla leikkausvirralla poltettaessa hyvin erilaisia määriä savua, ja etenkin rasvakudoksen savuntuotto on silmämääräisesti arvioiden erittäin vähäistä. Toisaalta taas maksa ja lihas savuavat poltettaessa varsin voimakkaasti, ja huolimatta diatermia-veitseen yhdistetyn näytteenottoletkun imusta ja siitä, että kokeet suoritettiin vetokaapissa, näiden kudosten haju levisi kaikkialle huoneeseen. Onkin siis mahdollista, että poltettaessa esimerkiksi runsaasti savua tuottavaa lihasta juuri ennen vähäisesti

savuavaa rasvakudosta, laitteiston osissa ja huoneilmassa viipyilevä haju häiritsee kudosspesifisen spektrin esiin saamista ja kudostyyppin oikeaa luokittelua. Jatkossa tulisikin tarkastella mahdollisuuksia savumäärän normalisoimiseksi, jottei esimerkiksi lihaksen polttamisesta syntyvä runsas savu jää näkymään seuraavissa analyyseissa.

Vaikka peräkkäisten näytteiden savuntuotto ei eroaisikaan merkittävästi, jää aiemmin poltettujen näytteiden savukaasuista mahdollisesti jäämiä laitteiston letkuihin ja/tai käytettyyn suodattimeen. Tämä voi näkyä seuraavan kudospolton spektrissä häiriönä, jonka vuoksi spekrien välillä ei näy niiden todellista eroa. Kyseistä ongelmaa voidaan kutsua “carry-over” –efektiksi. Savuntuoton eroavaisuuksien ja carry-overin tuottamat ongelmat voitaneen välttää siirtymällä jatkuvasta kirurgisen savun DMS-analyysistä pistemäisiin, tarvittaessa suoritettaviin spektrin tarkasteluihin, sekä vaihtamalla suodatin uuteen riittävän usein, leikkaussalikäytössä esimerkiksi päivittäin.

Kun testataan useita eri kudoksia peräkkäisenä sarjana, diatermia-veitsen terää ei ole mahdollista vaihtaa kudoksesta toiseen siirryttäessä. Veitsen terään kertyi aina kudosta poltettaessa karstaa, joka väistämättä jäi terään myös seuraavien saman sarjan kudospolttojen ajaksi. On mahdollista, että nämä karstajäänteet vaikeuttavat osaltaan kullekin kudokselle spesifisen spektrin havaitsemista tuoden niihin elementtejä aiemmin poltetuista kudoksista. Koepoltoissa terä kuitenkin painettiin kudoksen pinnan läpi maksimaalisen savuntuoton vuoksi, toisin kuin todellisissa kirurgisissa operaatioissa, joissa sähkövirta vaikuttaa kudokseen valokaaren välityksellä. Diatermian sijasta menetelmää on myös mahdollista käyttää laserveitsen kanssa, jolloin karstaongelmaa ei synny. Terän karstoittuminen ei oletettavasti todellisessa käyttötilanteessa muodosta merkittävää ongelmaa.

Edellä mainittujen syiden lisäksi tuloksiin kiistatta vaikuttivat tekniset ongelmat uuden laitteiston kanssa: polttokokeita ei kyetty suorittamaan ennalta suunnitellulla tavalla laitteiston optimaalisten asetusten hakemiseen kuluneen ajan sekä ohjelmisto-ongelmien vuoksi. Erityisen ongelmallista tämä oli lihas-rasva-aivo-munuainen-maksa-koesarjassa, joka keskeytyi joka kerta ennen aikojaan ohjelmistovian vuoksi. Kuitenkin jokaista

kudostyyppiä saatiin poltettua ainakin kerran, ja tulokset vaikuttavat lupaavilta kudosten oikean luokittelun onnistumisen suhteen.

Kokeissamme emme saavuttaneet aivan vastaavaa erottelutarkkuutta kuin esimerkiksi Balog ym. (2010) tutkiessaan iKnifen mahdollisuuksia glioblastoomien ja terveen aivokudoksen tunnistamisessa. Laitteistomme on kuitenkin vasta testausvaiheessa, kokeet olivat alustavia, ja testattuja kudoksenäytteitä vain muutamia. Tällä erää saatuja tuloksia voidaan tätä taustaa vasten pitää lupaavina, ja kokeissa tunnistettiin runsaasti ongelmakohtia, joita ratkaisemalla päästäneen parempaan erottelutarkkuuteen.

LÄHTEET

Agar NY, Golby AJ, Ligon KL, Norton I, Mohan V, Wiseman JM, Tannenbaum A, Jolesz FA. Development of stereotactic mass spectrometry for brain tumor surgery. *Neurosurgery*. 2011 Feb;68(2):280.

Balog J, Sasi-Szabó L, Kinross J, Lewis MR, Muirhead LJ, Veselkov K, Mirnezami R, Dezső B, Damjanovich L, Darzi A, Nicholson JK. Intraoperative tissue identification using rapid evaporative ionization mass spectrometry. *Science translational medicine*. 2013 Jul 17;5(194):194ra93-.

Balog J, Szaniszló T, Schaefer KC, Denes J, Lopata A, Godorhazy L, Szalay D, Balogh L, Sasi-Szabó L, Toth M, Takats Z. Identification of biological tissues by rapid evaporative ionization mass spectrometry. *Analytical chemistry*. 2010 Aug 3;82(17):7343-50.

Bastien JJ, McNeill KA, Fine HA. Molecular characterizations of glioblastoma, targeted therapy, and clinical results to date. *Cancer*. 2015 Feb 15;121(4):502-16.

Brandes AA, Tosoni A, Franceschi E, Reni M, Gatta G, Vecht C. Glioblastoma in adults. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2008 Aug;67(2):139-52

Chandana SR, Movva S, Arora M, Singh T. Primary brain tumors in adults. *American family physician*. 2008 May 15;77(10).

Chaurand P, Schwartz SA, Billheimer D, Xu BJ, Crecelius A, Caprioli RM. Integrating histology and imaging mass spectrometry. *Analytical chemistry*. 2004 Feb 15;76(4):1145-55.

DynaMed Plus [Internet]. Ipswich (MA): EBSCO Information Services. 1995 - . Record No. 116043, Glioblastoma; (päivitetty 16.5.2016 luettu 20.5.2016). Saatavilla Internetissä (vaatii käyttäjätunnuksen) <http://www.dynamed.com/login.aspx?direct=true&site=DynaMed&id=116043>.

Eiceman GA, Karpas Z, Hill Jr HH. Ion mobility spectrometry. CRC press; 2013 Dec 10.

Gaillard F. Glioblastoma. Radiopaedia.org [Online] Luettu 19.6.2016. Saatavilla Internetissä: <http://radiopaedia.org/cases/glioblastoma-49>

Gaillard F. Glioblastoma (gross pathology). Radiopaedia.org [Online] Luettu 19.6.2016. Saatavilla Internetissä: <http://radiopaedia.org/cases/glioblastoma-gross-pathology>

Gaillard F. Radiation induced meningiomas. Radiopaedia.org [Online] Luettu 19.6.2016. Saatavilla Internetissä: <http://radiopaedia.org/cases/meningioma-rx2>

Gomes J, Al Zayadi A, Guzman A. Occupational and environmental risk factors of adult primary brain cancers: a systematic review. The international journal of occupational and environmental medicine. 2011 Mar 14;2(2 April).

Greenberg H, Chandler WF, Sandler HM. Brain tumors. Oxford University Press, USA; 1999.

Hart MG, Garside R, Rogers G, Stein K, Grant R. Temozolomide for high grade glioma. Cochrane Database Syst Rev. 2013 Jan 1;4.

Honkanen J. Kirurginen diatermialaite [online]. Päivitetty 26.6.2006, luettu 20.5.2016. Saatavilla Internetissä <http://www.kolumbus.fi/jukka.u.honkanen/tdata/kirdiate.pdf>

Joensuu H, Kankaanranta L, Tenhunen M, Saarilahti K. Boorineutronisädehoitoa (BNCT) syöpään. Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim 2011;127(16):1697-703

Joensuu H, Roberts PJ, Kellokumpu-Lehtinen P-L, Jyrkkiö S, Kouri M, Teppo L (toim.). Syöpätaudit [online]. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 2013 (luettu 20.05.2016). Saatavilla Internetissä (vaatii käyttäjätunnuksen): www.oppiportti.fi/op/syt0050.

Jääskeläinen J, (toim.). Neurokirurgia [online]. Helsinki: HYKS Neurokirurgian klinikka, 1998 (luettu 14.8.2016). Saatavilla Internetissä: <https://www.terkko.helsinki.fi/kurssikirjasto/jaaskelainen/neurokirurgia.pdf>

Kang JS. Principles and applications of LC-MS/MS for the quantitative bioanalysis of analytes in various biological samples. Tandem Mass Spectrometry—Applications and Principles. 2012 Feb 29;441-92.

Kozak KR, Moody JS. Giant cell glioblastoma: a glioblastoma subtype with distinct epidemiology and superior prognosis. Neuro-oncology. 2009 Dec 1;11(6):833-41.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N et-al. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. W B Saunders Co. (2005) ISBN:0721601871.

Lee JH. Meningiomas, Diagnosis, Treatment, and Outcome. Springer Verlag. (2009) ISBN:1848829108

Lutterbach J, Guttenberger R, Pagenstecher A. Gliosarcoma: a clinical study. Radiotherapy and Oncology. 2001 Oct 31;61(1):57-64.

Malmer B, Henriksson R, Grönberg H. Familial brain tumours—genetics or environment? A nationwide cohort study of cancer risk in spouses and first-degree relatives of brain tumour patients. International journal of cancer. 2003 Aug 20;106(2):260-3.

McGirt MJ, Chaichana KL, Gathinji M, Attenello FJ, Than K, Olivi A, Weingart JD, Brem H, Quiñones-Hinojosa AR. Independent association of extent of resection with survival in patients with malignant brain astrocytoma: clinical article. Journal of neurosurgery. 2009 Jan;110(1):156-62.

Mäkinen M, Carpén O, Kosma V-M, Lehto V-P, Paavonen T, Stenbäck F (toim.). Patologia [online]. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 2012 (luettu 20.05.2016). Saatavilla Internetissä (vaatii käyttäjätunnuksen): www.oppiportti.fi/op/pat0079

Ohgaki H, Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma. Clinical cancer research. 2013 Feb 15;19(4):764-72.

Oksala Niku (2016). Suullinen tiedonanto 11.7.2016.

Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Teppo L, Thomas DB. Cancer incidence in five continents Vol. VIII. IARC scientific publications. 2002;155.

Ramnani D. Meningioma - gross pathology and histology. Radiopaedia.org [Online] Luettu 19.6.2016. Saatavilla Internetissä: <http://radiopaedia.org/cases/meningioma-gross-pathology-and-histology-1>

Roine A (2014) Novel Spectrometric Methods in Detection of Prostate Cancer and Urinary Tract Infection. Tampere: Tampere University Press

Schwartz SA, Weil RJ, Thompson RC, Shyr Y, Moore JH, Toms SA, Johnson MD, Caprioli RM. Proteomic-based prognosis of brain tumor patients using direct-tissue matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. Cancer research. 2005 Sep 1;65(17):7674-81.

Schäfer KC, Dénes J, Albrecht K, Szaniszló T, Balog J, Skoumal R, Katona M, Tóth M, Balogh L, Takáts Z. In vivo, in situ tissue analysis using rapid evaporative ionization mass spectrometry. Angewandte Chemie International Edition. 2009 Oct 19;48(44):8240-2.

Soinila S, Kaste M (toim.). Neurologia [online]. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 2015(luettu 20.05.2016). Saatavilla Internetissä (vaatii käyttäjätunnuksen): www.oppiportti.fi/op/neu00007

Taheri A, Mansoori P, Sandoval LF, Feldman SR, Pearce D, Williford PM. Electrosurgery: part I. Basics and principles. Journal of the American Academy of Dermatology. 2014 Apr 30;70(4):591-e1.

Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, Kos I, Batnig-Haberle I, Jones S, Riggins GJ, Friedman H. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. New England Journal of Medicine. 2009 Feb 19;360(8):765-73.

Zagzag D, Goldenberg M, Brem S. Angiogenesis and blood-brain barrier breakdown modulate CT contrast enhancement: an experimental study in a rabbit brain-tumor model. American journal of neuroradiology. 1989 May 1;10(3):529-34.